

# **SVEUČILIŠTE U ZAGREBU**

## **PRIRODOSLOVNO- MATEMATIČKI**

### **FAKULTET BIOLOŠKI ODSJEK**

Uzročnik račje kuge: *Aphanomyces astaci* Schikora, 1906

Causative agent of the crayfish plague: *Aphanomyces astaci* Schikora, 1906

SEMINARSKI RAD

Ana Petrović

Preddiplomski studij

Mentor: Ivana Maguire

Zagreb, 2018

# SADRŽAJ

1. UVOD	3
2. OPĆENITO O VRSTI <i>APHANOMYCES ASTACI</i>	4
3. ŽIVOTNI CIKLUS	5
4. DOMAĆINI	7
5. GENETIČKA RAZNOLIKOST UNUTAR VRSTE <i>A. ASTACI</i>	11
6. DOLAZAK U EUROPU I FAZE ZARAZE	13
6.1. Prva faza	13
6.2. Druga faza	14
6.3. Treća faza	15
7. NALAZI PATOGENA <i>A. ASTACI</i> NA BALKANU I LATENTNE ZARAZE	16
8. ZAKLJUČCI	18
SAŽETAK	20
SUMMARY	20

## 1. UVOD

Ekološki sustavi temelje se na vezi između staništa i organizama (biocenoze) koji na tom staništu žive, međusobno povezanih direktnim i indirektnim interakcijama. Međuodnosi organizama temelje se na raspodijeli niša, trofičkih razina te njihovom preklapanju kao i kruženju tvari i energije. Ravnoteža u ekološkom sustavu može biti poremećena na više načina, od promjena u abiotičkim čimbenicima do nestajanja ili pojave novih organizama, a sve to ima utjecaj na biološku raznolikost nekog područja (Chapin et al., 2000). Unos novih vrsta u ekosustave može biti posljedica ekstremnih vremenskih uvjeta, slučajnih unosa od strane drugih organizama ili pak slučajnog odnosno namjernog djelovanja čovjeka. Bolesti, loši ekološki uvjeti, kompeticija, fragmentacija staništa ili određena antropogena djelovanja (onečišćenje) mogu dovesti do privremenog ili trajnog nestanka vrsta.

Veliku ulogu u bioraznolikosti i ravnoteži sustava imaju tzv. ključne vrste. Pojam prvi puta spomenut i objašnjen u Paine (1969), odnosi se na vrste koje, disproporcionalno svojoj brojnosti, imaju značajan utjecaj na ravnotežu i brojnost ostalih vrsta u ekosustavu (Power, 1996). U slatkovodnim ekosustavima, kao primjer se mogu navesti riječni rakovi. Riječni rakovi (eng. Freshwater crayfish) obuhvaćaju preko 640 slatkovodnih vrsta natporodice Astacoidea (sjeverna hemisfera) i Parastacoidea (južna hemisfera) svrstanih u red Decapoda. Tipovi staništa riječnih rakova variraju; od rupa koje buše u supstratu i u kojima mogu provesti dio ili čak cijeli životni vijek, preko otvorenih prostora u rijekama, potocima i jezerima, do špilja (Crandall i Buhay, 2008). Uz prehranu koja se sastoji od malih mekušaca, ostalih rakova i ličinki kukaca (Jernelöv, 2017), treba naglasiti i njihovu herbivornost kojom kontroliraju brojnost primarnih proizvođača (Nyström i Strand, 1996). Pretjerano bujanje fitoplanktona i makrofita dovodi do ogromnih stopa primarne proizvodnje koje u konačnici dovode do eutrofikacije sustava te za sobom povlače hipoksiju vode i izumiranje organizama na tom području.

U posljednja dva stoljeća došlo je do drastičnog smanjenja brojnosti autohtonih vrsta riječnih rakova na području Europe kao rezultat pogoršanih okolišnih uvjeta uzrokovanih gubitkom staništa i onečišćenjem, te unosom alohtonih vrsta rakova i izbijanjem epidemija bolesti (Holdich et al., 2009). Najgori i najistraženiji primjer bolesti koja je pogodila populacije riječnih rakova u čitavoj Europi i izazvala masovne pomore je svakako račja kuga koju uzrokuje patogen *Aphanomyces astaci* Schikora (Alderman, 1996; Unestam, 1972). Ova događanja su dovela do toga da se broj populacija čak tri, od pet autohtonih europskih vrsta riječnih rakova, - *Astacus*

*astacus* (L.) (riječni rak), *Austropotamobius pallipes* (Lereboullet) (bjelonogi rak) i *Austropotamobius torrentium* (Schränk) (potočni rak) – toliko prorijedio da su ove vrste uvedene na crveni popis ugroženih vrsta IUCN-an (Edsman et al., 2010), kao i na Direktivu o zaštiti prirodnih staništa i divlje faune i flore (Europska komisija, 1992). U Hrvatskoj su zaštićene Zakonom o zaštiti prirode (NN 80/13) i Pravilnikom o strogo zaštićenim vrstama (NN 144 / 13).

## 2. OPĆENITO O VRSTI *APHANOMYCES ASTACI*

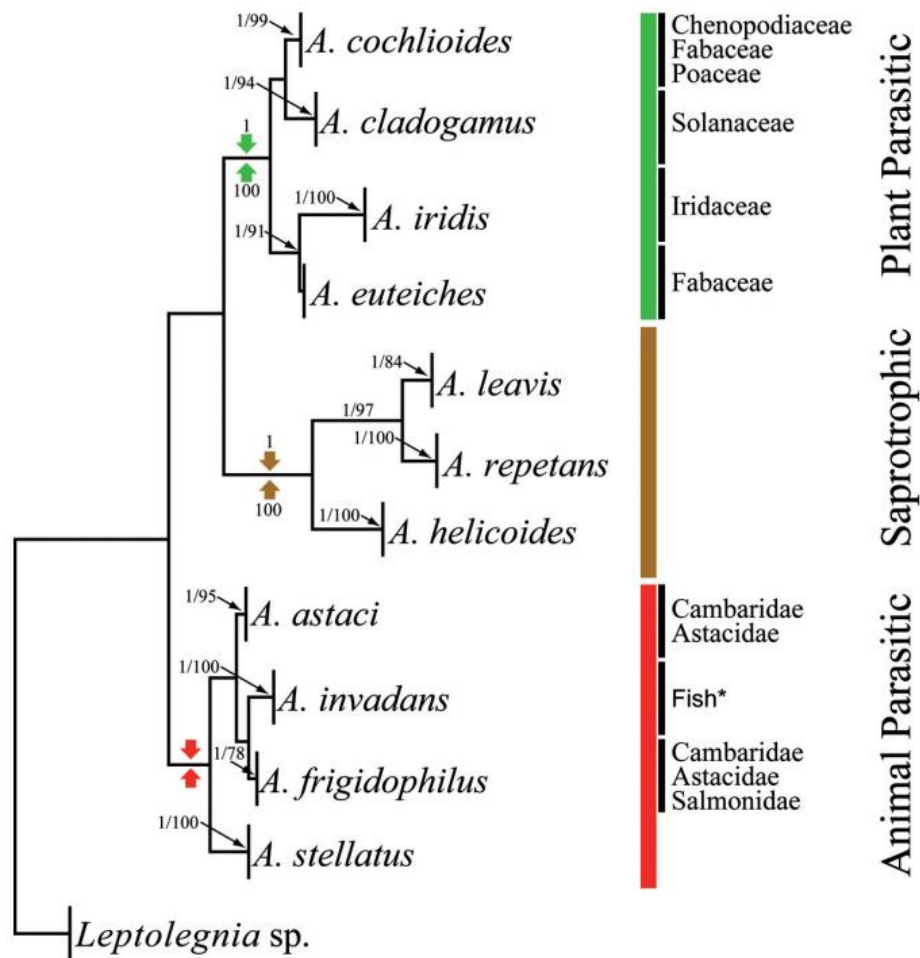
*Aphanomyces astaci* spada u razred Oomyceta (algašice). Dugo se nije znalo točno podrijetlo i klasifikacija ovog razreda, no sekvenciranjem i analizom gena za proteine alfa tubulina, beta tubulina, aktina i faktora I-alfa paralelno s rezultatima analize male ribosomske podjedinice razriješile su se mnoge dileme vezane uz filogeniju eukariota na razini carstva (Baldauf et al., 2000). Tako se prvotno mišljenje da razred Oomyceta pripada u carstvo gljiva pokazalo netočnim te su svrstane u tzv. 'supercarstvo' Chromalveolata (Baldauf et al., 2000). Smatra se da svoje monofiletsko podrijetlo vuku iz morskih organizama koje najvećim dijelom karakteriziraju holokarpija<sup>1</sup> i gotovo isključivi parazitizam. Parazitizam je kao svojstvo vrlo konzervirano i javlja se u velikom broju recentnih redova (Beakes et al., 2012).

Čak 60% poznatih vrsta ovog razreda pripada ekonomski bitnim biljnim parazitima (Thines i Kamoun, 2010) uzrokujući probleme kao što su npr. truljenje sjemena i korijena soje te pepelnica vinove loze (Rezinciuc et al., 2015). Najveći broj animalnih parazita napada životinje vezane za vodu kao što su ribe (Van Den Berg et al., 2013), vodozemci (Blaustein et al., 1994), te kukci čiji životni ciklus uključuje blizinu vode (npr. komarci) (Cerenius i Söderhäll, 1985). Iako rijetko, zabilježena je i vrsta koja uzrokuje bolesti na sisavcima (Mendoza, 2009).

Rod *Aphanomyces* obuhvaća neke od najštetnijih parazita kako na biljkama tako i životinjama (slika 1). Među najopasnijim animalnim patogenima su vrsta *A. astaci* koja uzrokuje račju kugu i uvrštena je u 100 najinvazivnijih vrsta (Lowe et al., 2004), te *Aphanomyces invadans* (Willoughby et al. 1995) odgovorna za neke od najgorih zaraza u slatkovodnim i estuarijskim ribljim populacijama uzrokujući epizootski ulcerativni sindrom (Lilley et al., 1998). Uz navedene biljne i animalne patogene linije, unutar roda postoji i saprofitska linija.

---

<sup>1</sup> proces stvaranja rasplodnih stanica iz cijelog talusa prilikom spolnog sazrijevanja



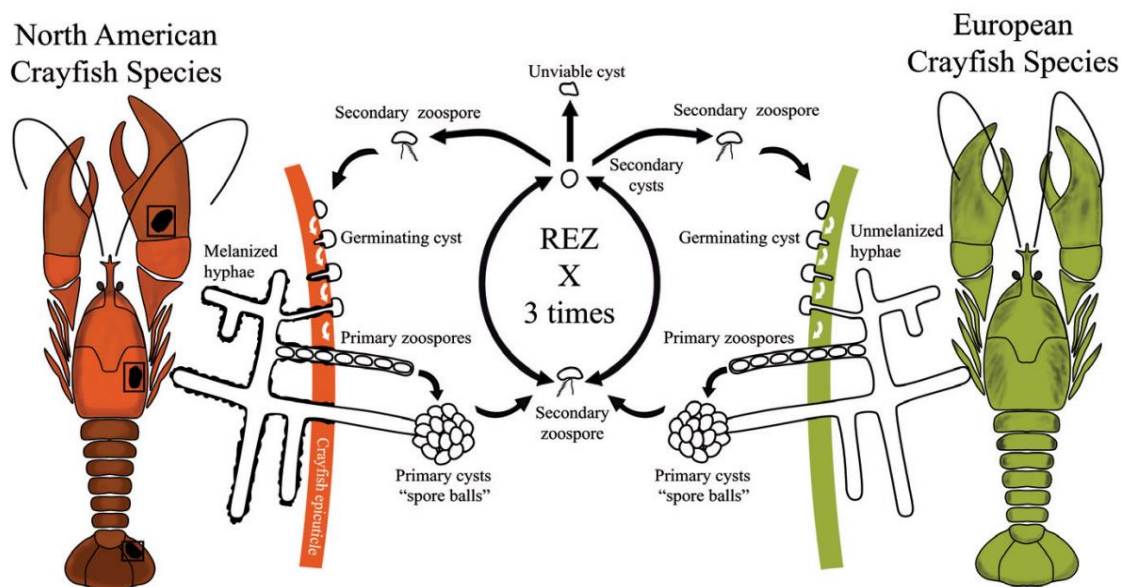
**Slika 1.** Filogram vrsta roda *Aphanomyces*. Prikazan je odnos između parazitskih i saprofitskih linija te njihova podjela prema domaćinima prema Diéguez-Urbeondo et al. (2009). Slika preuzeta iz Rezinciuc et al., 2015.

### 3. ŽIVOTNI CIKLUS

U rodu *Aphanomyces* zabilježeno je i spolno i nespolno razmnožavanje. Spolno razmnožavanje se javlja tijekom nepovoljnih uvjeta kako bi se osigurala genetička varijabilnost. Tijekom spolne faze nastaju oospore koje mogu poslužiti kao učinkovita ‘faza mirovanja’ tijekom nepovoljnih uvjeta. Kao takve, poželjne su kod biljnih patogena koji se moraju nositi s ekstremnim uvjetima u tlu kao što su temperaturne oscilacije, iznimna vlaga i suša, trošenje supstrata i sl. Suprotno tome, u animalnih parazita, spolno razmnožavanje je vrlo rijetko do nezabilježeno (Diéguez-Urbeondo et al., 2009).

Vrsta *A. astaci* je obligatni animalni parazit (Viljamaa-Dirks, 2016) i ima zabilježenu samo nespolnu fazu (Huang et al., 1994). Razlog tome prema Rezinciuc et al. (2015) može biti to što je u Europi zabilježen samo jedan od dva reproduktivna tipa potrebnih za spolno razmnožavanje, iako se dugo vjerovalo da ova vrsta ne posjeduje spolne strukture (Cerenius i Söderhäll, 1984).

Najbitniji trenutak nespolnog ciklusa je nastanak sekundarnih zoospora koje imaju ulogu infektivnih čestica u prenošenju zaraze (slika 3.). Proces počinje razvojem sporangija unutar hife s nizom primarnih zoospora s dva biča. Nakupljanjem spora na vrhu hife dolazi do stvaranja primarnih cisti iz kojih će se nakon nekog vremena razviti sekundarne biflagelatne zoospore. Kao takve, ovakve spore nemaju dug životni vijek i u stanju su preživjeti u vodi do tjedan dana (Oidtmann, 2012). Njihovo kretanje je potaknuto kemotaksijom sa ciljem pronalaska adekvatnog domaćina. Ukoliko do toga dođe, inducira se stvaranje ciste koja prijanja na kutikulu domaćina. Ubrzo nakon toga, cista počinje klijeti, probijajući kutikulu i meko tkivo jedinke koja, kao posljedica rasta micelija u tijelu, ugiba u roku od nekoliko dana. Micelij u zaraženoj jedinki započinje novi ciklus razvojem novih primarnih zoospora. Kao još jedna prilagodba na parazitski način života, javlja se i tzv. RZE (Repeated zoospore emergence) ciklus (Rezinciuc et al., 2015). Ova pojava se temelji na mogućnosti sekundarnih cisti da iznova stvore zoospore ukoliko je stvaranje ciste inducirano nespecifičnim podražajem kao što je slučajna promjena u ionskom naboju ili pH okoline. Ovim procesom se mogu inducirati i do tri uzastopne generacije zoospora (Cerenius i Söderhäll, 1984; Diéguez-Uribeondo et al., 2009). Točan odnos ciste i domaćina još nije dovoljno istražen i točan mehanizam prepoznavanja domaćina nije poznat (Rezinciuc et al., 2015).



**Slika 3.** Životni ciklus *Aphanomyces astaci* s razlikama između toka zaraze u autohtonih europskih (desno) i alohtonih sjevernoameričkih (lijevo) vrsta riječnih rakova (preuzeto iz Rezinciuc et al., 2015)

#### 4. DOMAĆINI

Iako se može reći da je vrsta *A. astaci* relativno usko specijaliziran parazit (Rezinciuc et al., 2015) i dalje se otkrivaju novi mogući domaćini. Najčešće se radi o vrstama koje ne pokazuju teže znakove zaraze ili služe kao vektori širenja. Upravo takve asimptomatske domaćine je teško identificirati (Oidtmann, 2012). Najveću podležnost najgorem ishodu zaraze pokazale su europske autohtone vrste riječnih rakova kao što su *A. astacus* i *A. pallipes* (tablica 1.) budući da jedinke ugibaju vrlo brzo nakon infekcije (Cerenius et al., 2003). Suprotno tome, sve dosada testirane sjevernoameričke vrste pokazuju nisku podložnost obolijevanju uslijed kontakta s patogenim zoosporama pri normalnim uvjetima.

**Tablica 1.** Vrste riječnih rakova i rezultati testova na podložnost zarazi patogenom *A. astaci*. Jedinke koje su opisane kao visoko podložne najčešće ugibaju uslijed izlaganja patogenu suprotno onima niske podložnosti. Kontinent podrijetla određen je prema Holdich et al. (2006)

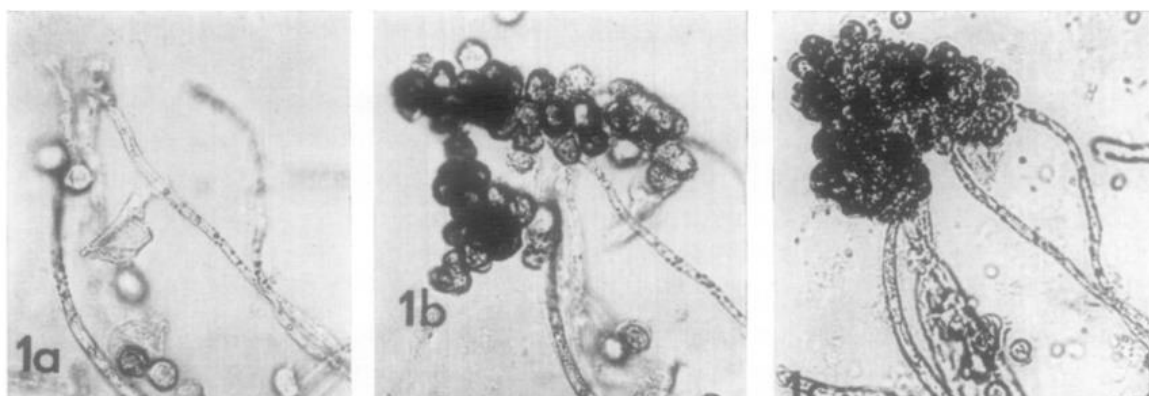
VRSTA	PORIJEKLO	PODLOŽNOST ZARAZI	NAVOD
<i>Cambarus acuminatus</i> Faxon	Sjeverna Amerika	Niska	4
<i>Cambarus batoni</i> (Fabricius)	Sjeverna Amerika	Niska	4
<i>Cambarus logulus</i> Girard	Sjeverna Amerika	Niska	4
<i>Faxonella clypeata</i> (Hay)	Sjeverna Amerika	Niska	4
<i>Orconectes limosus</i> (Rafinesque)	Sjeverna Amerika	Niska	4
<i>Orconectes virilis</i> (Hagen)	Sjeverna Amerika	Niska	4
<i>Orconectes propinquus</i> Girard	Sjeverna Amerika	Niska	4
<i>Pacifastacus leniusculus</i> (Dana)	Sjeverna Amerika	Niska	3,4
<i>Procambarus clarkii</i> Girard	Sjeverna Amerika	Niska	4
<i>Astacus astacus</i> (L.)	Europa	Visoka	2,4
<i>Astacius leptodactylus</i> Eschscholtz	Europa	Visoka	1
<i>Austropotamobius pallipes</i> (Lereboullet)	Europa	Visoka	1
<i>Austropotamobius torrentium</i> (Schränk)	Europa	Visoka	5

Navodi 1: Alderman et al. (1987), 2: Diéguez -Uribeondo i Söderhäll (1993), 3: Persson i Söderhäll (1983), 4: Unestam (1969), 5: Vorburger i Ribi (1999)

Rezistentnost sjevernoameričkih vrsta je posljedica paralelne evolucije patogena *A. astaci* i sjevernoameričkih rodova riječnih rakova (Unestam, 1972). Dugogodišnji suživot ovih dvaju organizama rezultirao je opstankom jedinki koje su razvile mehanizme suzbijanja zaraze na način da se spriječi prodiranje hife kroz egzoskelet (slika 2.). Tijekom klijanja, hife luče enzime koje pospješuju penetraciju kroz kutikulu i unos nutrijenata dobivenih iz razgrađenog materijala. Sastav izučenih enzima mijenja se prema fazi penetracije (Cerenius et al., 2009). Prateći strukturu kutikule rakova, prvi sloj (epikutikula) se sastoji od tankog sloja lipida ispod kojih se nalazi prokutikula. Kalcificirana prokutikula u svom sastavu ima mrežu hitinsko-proteinskih vlakana različitih orijentacija (Nagasawa, 2012). Shodno tome, u početku hife u većinskom udjelu luče odgovarajuće lipaze i proteinaze, a kako se približavaju prokutikuli (čiji je sastava sličan prethodnom sloju, ali veće stope kalcifikacije i udjela hitina) povećava se i lučenje hitinaze (Andersson i Cerenius, 2002). Za vrijeme rasta duboko u tkivu jedinke, hife luče i enzim sličan tripsinu također pronađen u hemolimfi zaraženih jedinki (Bangyeekhun et al. 2001).



Mehanizam obrane koje su razvile sjevernoameričke vrste rakova temelji se na konstitutivnoj sintezi proenzima profenoloksidaze (proPO) u hemolimfi jedinke. Treba naglasiti da se ne radi o otpornosti na zarazu već efikasnom načinu ograničavanja njezinog širenja. Već u ranim fazama zaraze, proPO se aktivira pri čemu nastaje feniloksidaza (PO), enzim koji sudjeluje u biosintezi slojeva melanina. Za razliku od hemocijanina koji se sintetizira u hepatopankreasu, proPO stvaraju hemociti (slika 2.) (Söderhäll i Cerenius, 1998).



**Slika 2.** Hemociti zaraženog riječnog raka koji okružuju hife *Aphanomyces astaci* (in vitro) 30 sec (1a), 10 min (1b), i 60 min (1c) nakon dodavanja svježeg uzorka hemolimfe na uzorak patogena (preuzeto iz Unestam i Nylund, 1972).

Melanin kao takav ima inhibirajući učinak na patogene mikroorganizme i, nakupljajući se na mjestu zaraze, sprječava njihovo daljnje širenje po organizmu (Söderhäll i Cerenius, 1998). Ovakav imunološki odgovor se očituje kao vidljive tamne pjege (melanizirane točke) na kutikuli rakova na mjestu prodora patogena (Slika 4) (Jernelöv, 2017).



**Slika 4.** Tamna, melanizirana pjega na distalnom segmentu kutikule s abdominalnog dijela riječnog raka (*A. astacus*) iz jezera Taulajärvi kao pokazatelj zaraze patogenom *A. astaci* (preuzeto iz Viljamaa-Dirks, 2016).

Usprkos efikasnosti ovakvog načina obrane, moguća je smrt jedinke ukoliko je imunološki sustav suprimiran ili je jedinka izložena nekom dodatnom stresu (gladovanje, nepovoljni abiotički čimbenici staništa, presvlačenje) (Cerenius et al., 2003).

U slučaju europskih autohtonih vrsta riječnih rakova, kako bi se postigla ovakva reakcija, potrebno je inducirati proizvodnju proPO. Induciranje sinteze do adekvatnih količina te njezina aktivacija odvijaju se presporo. Jedinka stvaranjem melanina ne stigne obuzdati zarazu na uskom području budući da cista počinje klijati vrlo brzo nakon prihvaćanja za kutikulu domaćina (Cerenius et al., 2009).

Osim spomenutih vrsta riječnih rakova, kao vektori širenje patogena mogu biti i druge vrste slatkovodnih organizama. Prvi takav slučaj je raspravljen u radu od Benisch (1940) gdje je zabilježeno ugibanje jedinki *Eriocheir sinensis* H. Milne-Edwards (kineska rakovica) i kao uzrok je naveden patogen *A. astaci*. Iako postoje određene dvojbe oko točne determinacije patogena u tom slučaju, daljnja istraživanja su hipotezu da *A. astaci* može uzrokovati infekcije i na drugim organizmima osim riječnih rakova pokazala točnom (Svoboda et al., 2014). DNA patogena *A. astaci* je pronađena u tkivima vrste *E. sinensis* uzorkovanog u Švedskoj, u kojem je rasprostranjena američka invazivna vrsta *P. leniusculus*, već poznati domaćin patogena. Isto

tako je DNA patogena utvrđena i u slatkovodnoj rakovici *Potamon potamios* (Olivier) koja je rasprostranjena u istom jezeru kao i vrsta *A. leptodactylus*, za koju se zna da može biti vektor širenja patogena (Svoboda et al., 2014). Količina zabilježene DNA isključuje mogućnost da se radi samo o slučajnom prijanjanju zoospora na kutikulu jedinki; količina zaraženog tkiva usporediva je s uznapređovalom zarazom u riječnih rakova. U slučaju kineske rakovice *E. sinensis*, može se pretpostaviti potencijalno širenje patogena na velike udaljenosti kao rezultat migracije rakovice uzvodno, dok kod vrste *P. potamios* uzvodne migracije nisu zabilježene (Svoboda et al., 2014). Iako usporedive razine zaraze, činjenica da su sve testirane jedinke rakova uhvaćene žive ukazuje na postojanje efikasnih mehanizama obrane od patogena.

## 5. GENETIČKA RAZNOLIKOST UNUTAR VRSTE *A. ASTACI*

Schikora je definirao vrstu *Aphanomyces astaci* kao uzročnika račje kuge 1906. godine. Prvu uspješnu izolaciju patogena iz zaražene jedinke izveo je Nybelin 1934. g. tako što je uzorak zaraženog živčanog vlakna riječnog raka stavio na podlogu od agra s 10-15%-tnim udjelom račje hemolimfe (eng. crayfish blood agar). Ponavljajući proces inokulacije, uspio je uzgojiti čistu kulturu vrste *A. astaci* čiju je patogenost dokazao u kontroliranim laboratorijskim uvjetima (Alderman i Polglase, 1986).

Od tada, izolirano je i klasificirano 5 različitih sojeva *A. astaci* (Huang et al., 1994; Kozubíková et al., 2011; Maguire et al., 2016) (tablica 2). Raznolikost sojeva je odraz različitih ekoloških uvjeta u kojima su evoluirali. Najstariji poznati soj (soj A) prvi puta je izoliran iz vrste *A. astacus* i smatra se da je odgovoran za prvu fazu epidemije račje kuge u Europi. Ne zna se koja alohtona vrsta je služila kao prenositelj patogena u Europu. Soj B je izoliran iz alohtone vrste *P. leniusculus* američkog porijekla, dok je soj C pronađen u istoj vrsti ali podrijetlom iz Kanade (Huang et al., 1994). Iz vrste *P. clarkii* izoliran je soj D (Diéguez-Uribeondo et al., 1995), a posljednji pronađeni soj E iz *O. limosus* (Kozubíková et al., 2011).

**Tablica 2.** Podjela sojeva prema domaćinima. Postoji više načina imenovanja sojeva kod različitih autora. Najlakši sustavi imenovanja pomoću slova abecede ili brojeva ne daju informaciju o domaćinu iz kojeg je soj prvi puta izoliran. No budući da je vjerojatnost

horizontalnog prijenosa među različitim domaćinima sve veća, postoji mogućnost da sustav As-Or s vremenom postane nepraktičan (prilagođeno prema Svoboda et al., 2017).

SOJ	ALTERNATIVNI NAZIVI ZA SOJEVE	ORIGINALNI DOMAĆIN	NAVOD
A	1 (Andersson i Cerenius, 2002), As (Viljamaa-Dirks et al., 2013)	Nepoznat	Huang et al. (1994)
B	2 (Andersson i Cerenius, 2002), PsI (Viljamaa-Dirks et al., 2013)	<i>P. leniusculus</i>	Huang et al. (1994)
C	3 (Andersson i Cerenius, 2002), PsII (Viljamaa-Dirks et al., 2013)	<i>P. leniusculus</i>	Huang et al. (1994)
D	4 (Andersson i Cerenius, 2002), Pc (Viljamaa-Dirks et al., 2013)	<i>P. clarkii</i>	Diéguez-Uribeondo et al. (1995)
E	Or (Viljamaa-Dirks et al., 2013)	<i>O. limosus</i>	Kozubíková et al. (2011)

Razlikovanje i identificiranje ovih sojeva omogućila je tehnika analize slučajno umnožene polimorfne DNA (RAPD) provedena prvi puta u tu svrhu 1994 (Huang, 1994) i ponovljena u kasnijim istraživanjima (Diéguez-Uribeondo et al., 1995; Kozubíková et al., 2011). Osim razlika među pojedinim sojevima, dokazane su i varijabilnosti unutar samih sojeva kroz AFLP-PCR metodu (Rezinciuc et al., 2014) i analizom mikrosatelitskih markera (Grandjean et al., 2014; Maguire et al., 2016). Analizom mikrosatelitnih markera je utvrđeno da se sojevi A i D značajno razlikuju od sojeva B, C i E. Razlog tome mogu biti klimatski uvjeti staništa u kojima su evoluirali navedeni sojevi; sojevi B, C i E izolirani su iz vrsta koje obitavaju u više umjerenim klimama, dok je soj D vidljivo prilagođen na više temperature (Grandjean et al., 2014; Rezinciuc et al., 2014). Također je definirana podjela soja A na podskupine A1 i A2. Očekivano je, ali i potrebno naglasiti, da sojevi ne pokazuju podudaranost filogenetske srodnosti domaćina (Grandjean et al., 2014).

Unatoč naglašavanju razlika u virulenciji različitih sojeva, postoje mnogi faktori koji utječu na agresivnost patogena odnosno podložnost zarazi. Jedan soj može imati različiti utjecaj na razvoj bolesti i smrtnost različitih populacija, dok različiti sojevi mogu pokazati isti ili sličan ishod (Kozubíková-Balcarova et al., 2014). Temperatura vode (Alderman et al., 1987), količina

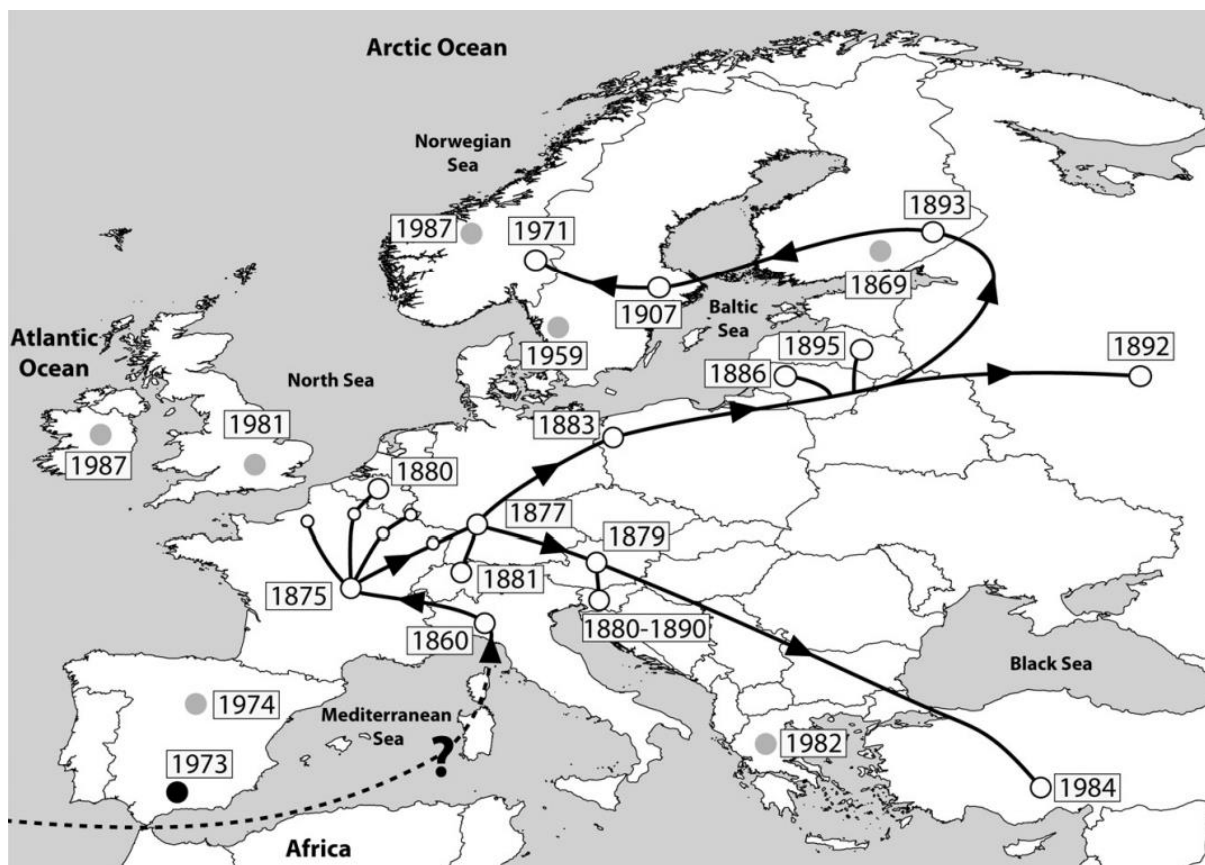
patogena (Makkonen et al., 2014), i zdravstveno stanje populacije odnosno prisutnost drugih patogena (Jussila et al., 2011) su samo neki od čimbenika koji pridonose ishodu zaraze.

## **6. DOLAZAK U EUROPU I FAZE ZARAZE**

### **6.1. Prva faza**

Prvi slučaj za koji se može reći da se radilo o račjoj kugi, budući da iznenadne visoke stope smrtnosti nisu zahvatile ostale slatkovodne organizme, zabilježen je 1859. g. u sjevernim talijanskim jezerima u Lombardiji (Ninni, 1865). Iz Italije, račja kuga se u prvoj fazi širi Europom od Francuske gdje je zabilježena 1874.g., preko zemalja srednje Europe, sve do sjevera (Švedska prvi put 1907.g., Litva 1920.g.) (Alderman, 1996). Širenje i rasprostiranje račje kuge kroz Europu s godinama izbijanja epidemija prikazano je na slici 5. Kao najvjerojatniji uzrok unosa račje kuge u Europu smatra se unos *A. astaci* putem kronično zaraženih sjevernoameričkih vrsta riječnih rakova (Rezinciuc et al., 2015). Iako se ne zna točno kojom se vrstom patogen unio u Europu, postoje dokazi o uvozu alohtonih američkih vrsta u drugoj polovici 19. st. Budući da se uvozi riječnih rakova nisu dokumentirali prije izbijanja epidemije, prvi takav unos odnosi se na 90 jedinki vrste *Orconectes limosus* (bodljobrađi rak) (Rafinesque) iz Sjeverne Amerike u jezero u Poljskoj tek 1890. g. (McDonald, 1983).

Mogući načini širenja zaraze uključuju uvoz zaraženih jedinki zbog uzgoja u svrhu prehrane. Samo jedan od mnogih takvih slučajeva, koji ukazuje na veliku potražnju za rakovima na tržištu, je primjer uvoza pošiljke od 1,9 milijuna zaraženih jedinki iz Finske u Švedsku 1906. g. Međutim, većina transportiranih jedinki uginula je još na putu i istresene su u jezero Mälaren u Stockholmu. U roku od godinu dana, većina populacije vrste *A. astacus* prirodno prisutne u jezeru podlegla je zarazi i uginula (Alm, 1924).



**Slika 5.** Širenje zaraze račjom kugom po Europi prikazano prema godinama izbijanja epidemija (preuzeto iz Rezinciuc et al., 2015).

Zaraza se osim trgovine zaraženim jedinkama mogla prenositi i zaraženom opremom, vodom i brodovima, ili drugim organizmima koji dolaze u doticaj sa zaraženim populacijama – ostale vrste rakova, riba, ptice (Oidtmann et al., 2002).

## 6.2. Druga faza

Račja kuga uzrokovala je ogromne ekonomske gubitke. Opetovani pokušaji unosa autohtonih vrsta iz nezaraženih u ekosustave opustošene račjom kugom nije se pokazalo efikasnim (Jernelöv, 2017). Uz to, javili su se ekološki problemi nastali uklanjanjem ključne vrste iz mnogih slatkovodnih ekosustava. Problem nastale prazne niše je pozivao na unos ekonomski iskoristive vrste sličnih ekoloških potreba, za koju ne postoji opasnost od ugibanja uzrokovanog patogenom *A. astaci*. Tako je uvezena sjevernoamerička vrsta *Pacifastacus leniusculus* (Dana) (signalni rak) iz svog prirodnog staništa u jezeru Tahoe u Kaliforniji (Führst, 2006).

Vrsta *P. leniusculus* uvezena je u Švedsku u više navrata u razdoblju od 1964. do 1969. g. (Bohman et al., 2006). Ovime započinje druga faza širenja kuge u Europi. Vrsta *P. leniusculus*

se ubrzo eksponencijalno proširila slatkovodnim sustavima, dosežući brojnost koja nadilazi brojnost autohtone vrste *A. astacus* (Jernelöv, 2017). U Španjolsku su iz istih razloga uvezene jedinke vrste *Procambarus clarkii* (Girard) u razdoblju od 1973. do 1974. g. Veza između uvoza ove vrste i ponovnog izbijanja račje kuge u Španjolskoj dokazana je u Diéguez-Uribeondo et al. (1997). Podaci o pomoru autohtonih vrsta uzrokovanom drugom fazom zaraze, uz Švedsku i Španjolsku, zabilježeni su u Engleskoj 1981. g. (Alderman, 1997), Grčkoj 1982. g. (Alderman, 1997), Turskoj 1984. g. (Alderman, 1997) i Irskoj 1986. g. (Matthews i Reynolds, 1992). U Norveškoj je 1971. g. zabilježena veća stopa mortaliteta i kao uzrok navedena račja kuga (Taugbøl et al., 1993), a kasnijim istraživanjem je utvrđeno da se uzročnik epidemije bio stari europski soj A (Strand, 2013).

Istraživanja su pokazala da unos vrsta *P. leniusculus* i *P. clarkii* nije imao štetne učinke na ekološku ravnotežu sustava u koje su uneseni (Jernelöv, 2017). Međutim, treba napomenuti da je svakim unosom nove alohtone vrste riječnih rakova unesen i novi soj patogena.

### 6.3. Treća faza

Prema Holdich et al. (2009), može se govoriti i o trećoj fazi širenja kuge prvenstveno uzrokovanom trgovinom riječnim rakovima kao sve popularnijim egzotičnim kućnim ljubimcima. Egzotični kućni ljubimci općenito za sobom vuku i loše načine zbrinjavanja kada postanu prevelika odgovornost. Do problema dolazi kada se zaražene jedinke puštaju u lokalne slatkovodne sustave isto kao i zaražena voda (Mrugała et al., 2015). To je dovelo do porasta broja dosad nezabilježenih alohtonih vrsta riječnih rakova, ponajviše u središnjoj Europi. Prema podacima o uvozu u Njemačku, ovakva trgovina je poprimila ogromne razmjere; zabilježen je unos i do sedam novih vrsta godišnje samo u periodu između 2005. i 2009. g. (Chucholl, 2013).

Kako bi se ukazalo na opasnost ovakvog postupanja, provedeno je istraživanje o dosegu rasprostranjenosti *A. astaci* kao posljedice trgovanja kućnim ljubimcima (Panteleit et al., 2017). Istraživanje je provedeno prema metodologiji iz Mrugała (2015) na 85 jedinki 50 različitih vrsta rakova, većinom sjeverno- i centralno-američkog podrijetla. Sve testirane jedinke su dostupne za prodaju u trgovinama kućnim ljubimcima u Njemačkoj te su kao takve potencijalni nositelji patogena i time prijetnja autohtonim ekosustavima. U 11 testiranih vrsta je utvrđena DNA patogena *A. astaci*; od kojih je devet vrsta po prvi puta potvrđeno kao domaćini patogena (tablica 3.). Od devet novih definiranih domaćina, za 3 vrste (*Orconectes eupunctus* Williams, 1952, *Orconectes hylas* (Faxon, 1890) i *Procambarus pygmaeus* Hobbs, 1942) determinacija vrste rakova na temelju morfologije nije se mogla potvrditi sekvencama iz GeneBank-a. Iako

nije moguće zaključiti u kojem su trenutku jedinke bile zaražene (prije ili nakon dolaska u trgovinu kućnim ljubimcima), bitno je naglasiti kako je zaraza horizontalnim prijenosom lako moguća budući da su jedinke u trgovini smještene jako blizu jedna druge. Svaka od navedenih alohtonih vrsta predstavlja stvarnu prijetnju autohtonim ekosustavima. Iako puštanje zaraženih jedinki u divljinu ne mora rezultirati novom održivom populacijom te vrste rakova, dovoljna je samo jedna jedinka zaražena patogenom *A. astaci* da dođe do ponovnog izbijanja epidemije na tom području (Pantleit et al., 2017).

U provedenom istraživanju se ukazuje i na važnost točne determinacije unesenih vrsta riječnih rakova. Nije rijetko da se vrste riječnih rakova prodaju pod krivim nazivom, ako je determinacija uopće provedena (Faulkes, 2015). Zakoni i regulacije unosa živih alohtonih vrsta nisu dovoljna mjera zaštite u većini država Europe (Panteleit et al., 2017) već je potrebna i edukacija vlasnika i prodavača dućana kućnim ljubimcima (Faulkes, 2015).

**Tablica 3.** Vrste i broj testiranih jedinki za koje je utvrđeno da su zaražene *A. astaci*. Razina zaraze kreće se od A0 (nezaražene) do A6 (visoka koncentracija patogena). Vrste koje su prvi puta definirane kao domaćini prikazane su masno otisnutim slovima (prema Panteleit et al., 2017).

VRSTE TESTIRANIH RIJEČNIH RAKOVA (n)	RAZINA ZARAZE					
	A0	A1	A2	A3	A4	A6
<b><i>Cambarus fasciatus</i> Hobbs, 1981 (3)</b>	1	1	1			
<b><i>Cambarus manningi</i> Hobbs, 1981 (4)</b>	1	2	1			
<i>Orconectes</i> sp. (1)				1		
<i>Orconectes</i> sp. (1)					1	
<b><i>Orconectes luteus</i> (Creaser, 1933) (1)</b>			1			
<b><i>Orconectes neglectus</i> (Faxon, 1885) (1)</b>			1			
<b><i>Orconectes ozarkae</i> Williams, 1952 (1)</b>			1			
<i>Pacifastacus leniusculus</i> (4)	2	1	1			
<i>Procambarus llamas</i> Villalobos 1954 (1)						1
<i>Procambarus</i> sp. (1)			1			
<b><i>Procambarus simulans</i> (Faxon, 1884) (2)</b>		1	1			

## 7. NALAZI PATOGENA *A. ASTACI* NA BALKANU I LATENTNE ZARAZE



Podaci o akutnim, visokim stopama smrtnosti riječnih rakova na području Balkana čiji je uzrok patogen *A. astaci* zabilježeni su kroz sve ranije navedene faze širenja epidemija. Konkretno na području Hrvatske je za vrijeme prve faze zabilježeno uginanje populacija riječnih rakova u rijekama crnomorskog slijeva (Lindes, 1884; Anonimus, 1897). Druga faza u Hrvatskoj je zapažena kao izbijanje epidemija krajem 1960-ih (Plančić, 1973).

Prema radu Maguire et al. (2016), provedeno je istraživanje u kojem su testirane autohtone (*A. torrentium*, *A. astacus*, *A. pallipes* i *A. leptodactylus*) i alohtone (*O. limosus*, *P. leniusculus* i *Cherax quadricarinatus* (Von Martens, 1868)) vrste riječnih rakova na prisutnost sojeva *A. astaci*. Vrste su uzorkovane u razdoblju od 2003. do 2013. godine iz rijeka jadranskog i crnomorskog slijeva. Rezultati su pokazali da su sve testirane vrste zaražene *A. astaci*. Jedina iznimka su svih 6 jedinki vrste *C. quadricarinatus* uzorkovanih u Sloveniji od kojih nijedna nije pokazala znakove zaraze. Metodom mikrosatelitnih markera (Grandjean et al., 2014), analizirane su jedinke koje su pokazale razinu zaraze A4-A6 kako bi se utvrdilo o kojim se sojevima radi. Podtipovi soja A nađeni su u jedinkama vrsti *A. torrentium* i *A. astacus*. Soj izoliran iz uginule jedinke vrste *A. torrentium* uzorkovane iz potoka Kraljevac (Medvednica) pokazao je razliku u jednom alelu od dosad opisanih sojeva A (SSR-A<sub>3</sub>), dok su jedinke vrste *A. astacus* uzorkovanih u Plitvičkim jezerima i Mrežnici zaražene podtipom SSR-A<sub>2</sub>. Soj SSR-B bio je prisutan u jedinkama *A. leptodactylus*, dok je u jednoj od jedinki *P. leniusculus* pronađen novi podtip soja B s razlikom u dva alela (SSR-B<sub>2</sub>). Treba naglasiti da se prvi puta kroz ovo istraživanje opisan soj koji je naizgled kombinacija sojeva A i B pronađen u jedinkama *A. leptodactylus* iz jezera Jagodno (Velika Gorica). Ne zna se točno način nastanka ovakvog kombiniranog genotipa, ali moguće je da je došlo do rekombinacije među sojevima. Općenito je razina zaraze u alohtonim vrstama bila niska – samo je jedna jedinka imala razinu zaraze A5.

U Bosni i Hercegovini, potaknuto novim izbijanjem epidemije račje kuge u srpnju 2015. g. na Mostarskom Blatu, istraživanje provedeno na miješanoj populaciji vrsta *A. astacus* i *A. pallipes* rezultiralo je pronalaskom *A. astaci* soja A u svih 11 testiranih jedinki *A. astacus*. Jedina testirana jedinka *A. pallipes* pokazala je razinu zaraze A0 (nezaražena) (Mrugała et al., 2017). Budući da alohtone vrste riječnih vrsta na području Bosne i Hercegovine još nisu zabilježene (Trožić-Borovac, 2011), mogu se pretpostaviti dva moguća scenarija za iznenadno izbijanje epidemije. Moguće je da se radi o horizontalnom prijenosu patogena *A. astaci* iz nekih možda nezabilježenih zaraženih populacija riječnih rakova (Mrugała et al., 2017) na načine već opisane u prijašnjim poglavljima. Druga mogućnost je da je došlo do aktivacije latentne zaraze već prisutne na tom području (Mrugała et al., 2017).

Latentne zaraze karakterizira izostajanje znakova bolesti na jedinkama iako u sebi nose patogen (Jussila et al., 2014). Osim ovakvih opisanih slučajeva u populaciji *A. pallipes* i *A. astacus* u Hrvatskoj te *A. astacus* u Bosni i Hercegovini, slične pojave su opisane na vrsti *A. leptodactylus* u Turskoj (Kokko et al., 2012) i Rumunjskoj (Pârvulescu et al., 2012), i *A. torrentium* u Sloveniji (Kušar et al., 2013).

U ovako latentno zaraženim populacijama utvrđen je patogen soja A i njegovi podtipovi, uz par zabilježenih slučajeva uzrokovanih sojem B (Maguire et al. 2016). Budući da je poznato da je soj A uzrokovao prvu i najagresivniju fazu zaraze u Europi, na pitanje kako su navedene autohtone vrste riječnih rakova preživjele noseći u sebi ovaj genotip *A. astaci* odgovara se s dva moguća scenarija. Prema Jussila et al. (2014), moguće je da se radi o stečenoj "otpornosti" na patogen koji je prisutan u Europi više od stoljeća. U ovom slučaju se pretpostavlja da je došlo do selekcije otpornijih jedinki riječnih rakova koje su posjedovale efikasnije mehanizme protiv izbijanja bolesti. Suprotno tome, Jernelöv (2017) pretpostavlja da se radi o selekciji manje virulentnih sojeva patogena koja proizlazi iz činjenice da je dulje preživljavanje zaražene jedinke raka evolucijski povoljnije za patogena. Može se pretpostaviti da se radi o kombinaciji ovih scenarija. Aktiviranje latentnih zaraza može se javiti uslijed loših okolišnih uvjeta koji uzrokuju organizmu stres. Stres kao takav može suprimirati obrambene mehanizme što rezultira prelaskom bolesti iz latentne u akutnu fazu i u konačnici uginuće jedinke.

## 8. ZAKLJUČCI

*Aphanomyces astaci* je kao uzročnik račje kuge prisutan u Europi od 1859.g. te i dalje predstavlja prijetnju autohtonim europskim slatkovodnim rakovima. Uz sve više načina horizontalnog prijenosa može se očekivati daljnje širenje patogena. Isto tako, treba napomenuti da se lista pogodnih domaćina može povećati i uključivati i ostale slatkovodne vrste, osim riječnih rakova, kao što je utvrđeno za kinesku rakovicu *E. sinensis*. Kako bi se dobio uvid u brzinu evolucije patogena, daljnjim istraživanjima potrebno je poboljšati metode determinacije sojeva. Nadalje, distribucija već poznatih sojeva nije dovoljno istražena na nekim područjima za koje se sumnja da postoji opasnost od izbijanja epidemije (npr. Grčka (Papavlasopoulou et al., 2014)).

Zasad nisu poznati efikasni načini suzbijanja zaraze na većim površinama iako su provedena testiranja učinka različitih supstanci na *A. astaci* (Cerenius et al., 1992; Rantamäki et al., 1992). Moguće je da odgovor leži u još nepoznatim aspektima životnog ciklusa *A. astaci* kao što je točan mehanizam lociranja domaćina.

Poznato je da je odnos domaćina i parazita sustav sklon brzom evoluciji kao posljedica njihove uske povezanosti (Van Baalen, 1998). Daljnjim razvojem/suživotom rakova i patogena možemo očekivati niz različitih ishoda: (1) vođeno primjerom najstarijeg soja A, može doći do opstanka/razvoja manje virulentnih sojeva na području Europe (ukoliko dođe do izumiranja autohtonih europskih vrsta riječnih rakova, moguće je da ovaj scenarij izostane), (2) ponovni unos novog, agresivnijeg soja kuge u Europu, ili (3) nastanak rekombinantnih sojeva nepoznate virulencije uslijed dolaska u kontakt sojeva koji na svojim prirodnim arealima ne bi došli u kontakt.

Potencijalno suzbijanje daljnjih izbijanja epidemija moguće je budućim praćenjem koevolucije patogena i potencijalnih domaćina, kao i stvaranjem preciznijih i efikasnijih regulativa o trgovanju i općenito unosu alohtonih vrsta, te edukacijom javnosti i mogućim razvojem efikasnih lijekova.

## SAŽETAK

Riječni rakovi važan su element slatkovodnih ekosustava. U posljednjih 200 godina došlo je do drastičnog smanjenja brojnosti autohtonih vrsta riječnih rakova na području Europe. Kao jedan od ključnih uzroka tog smanjenja navodi se izbijanje epidemija račje kuge uzrokovane patogenom *Aphanomyces astaci*. Infektivne čestice ove bolesti sekundarne su zoospore koje se stvaraju na krajevima hifa ovog obligatnog parazita. Osim riječnih rakova, kao vektori širenja ovog patogena opisane su i druge vrste rakova. Postoji pet opisanih sojeva *A. astaci*, od kojih su za dva opisani podtipovi. Smatra se da sojevi potječu iz dva vala unosa alohtonih sjevernoameričkih vrsta riječnih rakova na područje Europe. Opaženo je više oblika horizontalnog prijenosa *A. astaci*, poput prijenosa ribama, pticama i antropogenim djelovanjem (ribolovna oprema, brodovi i trgovina kućnim ljubimcima). Na Balkanu su pronađene latentno zaražene populacije, za koje se smatra da su zaražene u prva dva vala širenja ovog patogena. Razlike podtipova unutar sojeva *A. astaci*, kao i njihov utjecaj na ekosustave u kojima se nalaze, još su nedovoljno istraženi. Također su potrebna dodatna istraživanja metoda suzbijanja zaraze ovim patogenom kako bi se umanjio utjecaj *A. astaci* na europske autohtone vrste riječnih rakova.

## SUMMARY

Crayfish represent an important element of freshwater ecosystems. However, there has been a drastic decrease in the number of autochthonous species of crayfish in Europe over the past 200 years. Epidemic outbreaks of crayfish plague caused by the pathogen *Aphanomyces astaci* have been reported as one of the main causes of this decrease in abundance. The infective units of the disease are secondary zoospores produced at hypha ends of this obligatory parasite. Apart from crayfish, other crustacean species have also been identified as pathogen's hosts and carriers. There are five described genotype groups, two of which have multiple subtypes. It is considered that all of the strains originate from two waves of introduction of North American crayfish species into Europe. Multiple types of horizontal transmission of *A. astaci* have been observed, such as by fish, birds and anthropogenic activities (fishing equipment, ships and pet trade). Latent infections have been discovered in the Balkan region, which are considered to have been caused by the strains introduced by the first two phases /waves. Subtype differences within the different strains of *A. astaci* and their effect on ecosystems in which they are present are still inadequately studied. Furthermore, additional research of

infection control methods of this pathogen is required to reduce the impact of *A. astaci* on European freshwater crayfish and ecosystems in general.

## LITERATURA

- Alderman, D. J. (1997). History of the spread of crayfish plague in Europe, in crustaceans: bacterial and fungal diseases. *QIE Scientific and Technical Review*, 15, 15-23.
- Alderman, D. J. (1996). Geographical spread of bacterial and fungal diseases of crustaceans. *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)*, 15(2), 603–632.  
<https://doi.org/10.20506/rst.15.2.943>
- Alderman, D. J., Polglase, J. L., & Frayling, M. (1987). *Aphanomyces astaci* pathogenicity under laboratory and field conditions. *Journal of Fish Diseases*, 10(5), 385-393.
- Alderman, D. J., & Polglase, J. L. (1986). *Aphanomyces astaci*: isolation and culture. *Journal of Fish Diseases*, 9(5), 367–379.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.1986.tb01030.x>
- Alm, G. (1924). Notiser rörande kräftpesten i Sverige. *Svensk Fiskeritidskrift*, 33(6), 165-173.
- Andersson, M. G., & Cerenius, L. (2002). Analysis of chitinase expression in the crayfish plague fungus *Aphanomyces astaci*. *Diseases of aquatic organisms*, 51(2), 139-147.
- Anonimus (1897) Napučenje načih voda sa raci. *Šumarski List*, 4, 174-175
- Baldauf, S. L., Roger, A. J., Wenk-Siefert, I., & Doolittle, W. F. (2000). A kingdom-level phylogeny of eukaryotes based on combined protein data. *Science*, 290(5493), 972–977.  
<https://doi.org/10.1126/science.290.5493.972>
- Bangyeekhun, E., Cerenius, L., & Söderhäll, K. (2001). Molecular cloning and characterization of two serine proteinase genes from the crayfish plague fungus, *Aphanomyces astaci*. *Journal of invertebrate pathology*, 77(3), 206-216.
- Beakes, G. W., Glockling, S. L., & Sekimoto, S. (2012). The evolutionary phylogeny of the oomycete “fungi.” *Protoplasma*, 249(1), 3–19.  
<https://doi.org/10.1007/s00709-011-0269-2>
- Benisch, J. (1940). Künstlich hervorgerufener *Aphanomyces*—Befall bei Wollhandkrabben. *Zeitschrift für Fischerei*, 38, 71-80.
- Blaustein, A. R., Wake, D. B., & Sousa, W. P. (1994). Amphibian declines: judging stability, persistence, and susceptibility of populations to local and global extinctions. *Conservation biology*, 8(1), 60-71.
- Bohman, P., Nordwall, F., & Edsman, L. (2006). The effect of the large-scale introduction of signal crayfish on the spread of crayfish plague in Sweden. *Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture*, (380-381), 1291-1302.

- Cerenius, L., M.G. Andersson & K. Söderhäll. (2009) *Aphanomyces astaci* and crustaceans. U: K. Lamour i S. Kamoun (eds.). *Oomycete Genetics and Genomics: Diversity, Interactions and Research Tools*, 425-433.
- Cerenius, L., Bangyeekhun, E., Keyser, P., Söderhäll, I., & Söderhäll, K. (2003). Host prophenoloxidase expression in freshwater crayfish is linked to increased resistance to the crayfish plague fungus, *Aphanomyces astaci*. *Cellular microbiology*, 5(5), 353-357.
- Cerenius, L., Rufelt, S., & Söderhäll, K. (1992). Effects of Ampropylfos (RS)-1-aminopropylphosphonic acid) on zoospore formation, repeated zoospore emergence and oospore formation in *Aphanomyces* spp. *Pesticide science*, 36(3), 189-194.
- Cerenius, L., & Söderhäll, K. (1985). Repeated zoospore emergence as a possible adaptation to parasitism in *Aphanomyces*. *Experimental mycology*, 9(3), 9-63.
- Cerenius, L., & Söderhäll, K. (1984). Repeated zoospore emergence from isolated spore cysts of *Aphanomyces astaci*. *Experimental Mycology*, 8(4), 370-377.  
[https://doi.org/10.1016/0147-5975\(84\)90061-6](https://doi.org/10.1016/0147-5975(84)90061-6)
- Chapin III, F. S., Zavaleta, E. S., Eviner, V. T., Naylor, R. L., Vitousek, P. M., Reynolds, H. L., Hooper, D.U., Lavorel, S., Sala, O.E., Hobbie, S.E & Mack, M.C. (2000). Consequences of changing biodiversity. *Nature*, 405(6783), 234-242.  
<https://doi.org/10.1038/35012241>
- Chucholl, C. (2013). Invaders for sale: trade and determinants of introduction of ornamental freshwater crayfish. *Biological Invasions*, 15(1), 125-141.
- Crandall, K. A., & Buhay, J. E. (2008). Global diversity of crayfish (Astacidae, Cambaridae, and Parastacidae - Decapoda) in freshwater. *Hydrobiologia*, 595(1), 295-301.  
<https://doi.org/10.1007/s10750-007-9120-3>
- Diéguez-Urbeondo, J., García, M. A., Cerenius, L., Kozubíková, E., Ballesteros, I., Windels, C., Weiland, J., Kator, H., Söderhäll, K. & Martín, M. P. (2009). Phylogenetic relationships among plant and animal parasites, and saprotrophs in *Aphanomyces* (Oomycetes). *Fungal Genetics and Biology*, 46(5), 365-376.  
<https://doi.org/10.1016/j.fgb.2009.02.004>
- Diéguez-Urbeondo, J., Temiño, C., & Múzquiz, J. L. (1997). The crayfish plague fungus (*Aphanomyces astaci*) in Spain. *BFPP - Bulletin Francais de La Peche et de La Protection Des Milieux Aquatiques*, 70(347), 753-763.  
<https://doi.org/10.1051/kmae/1997051>
- Diéguez-Urbeondo, J., Huang, T. S., Cerenius, L., & Söderhäll, K. (1995). Physiological adaptation of an *Aphanomyces astaci* strain isolated from the freshwater crayfish *Procambarus clarkii*. *Mycological Research*, 99(5), 574-578.  
[https://doi.org/10.1016/S0953-7562\(09\)80716-8](https://doi.org/10.1016/S0953-7562(09)80716-8)

- Diéguez-Uribeondo, J., & Söderhäll, K. (1993). *Procambarus clarkii* (Girard) as a vector for the crayfish plague fungus, *Aphanomyces astaci* Schikora. *Aquaculture Research*, 24(6), 761-765.
- Edsman, L., Füreder, L., Gherardi, F., & Souty-Grosset, C. (2010). *Astacus astacus*. *The IUCN Red List of Threatened Species*, Version 2018.1.  
<http://www.iucnredlist.org/>
- Europska komisija (1992). DIREKTIVA VIJEĆA 92/43/EEZ o očuvanju prirodnih staništa i divlje faune i flore.  
ELI: <http://data.europa.eu/eli/dir/1992/43/2013-07-01>
- Faulkes, Z. (2015). The global trade in crayfish as pets. *Crustacean Research*, 44, 75-92.
- Fürst, M. (2006). Debatten om signalkräftan: ett främmande skadedjur som borde utrotas eller räddningen av en folkkär tradition  
[https://www.ifiske.se/Tengelin/MagnusBrev\\_till\\_Fiskeriverket.pdf](https://www.ifiske.se/Tengelin/MagnusBrev_till_Fiskeriverket.pdf)
- Grandjean, F., Vrålstad, T., Diéguez-Uribeondo, J., Jelić, M., Mangombi, J., Delaunay, C., Petrusek, A. (2014). Microsatellite markers for direct genotyping of the crayfish plague pathogen *Aphanomyces astaci* (Oomycetes) from infected host tissues. *Veterinary Microbiology*, 170(3-4), 317-324.  
<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.02.020>
- Holdich, D. M., Reynolds, J. D., Souty-Grosset, C., & Sibley, P. J. (2009). A review of the ever increasing threat to European crayfish from non-indigenous crayfish species. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems*, (394-395), 11.  
<https://doi.org/10.1051/kmae/2009025>
- Holdich, D.M., Haffner P., Noël, P.Y., Carral J., Füreder L., Gherardi F., Machino Y., Madec J., Pöckl, M., Śmietana, P., Taugbøl, T. & Vigneux, E. (2006) Species files. U: *Atlas of Crayfish in Europe* (ed. Souty-Grosset, C., Holdich, D.M., Noël, P.Y., Reynolds, J.D. & Haffner, P.) Muséum national d'Histoire naturelle, Paris. 49-129.
- Huang, T. Sheng, Cerenius, L., & Söderhäll, K. (1994). Analysis of genetic diversity in the crayfish plague fungus, *Aphanomyces astaci*, by random amplification of polymorphic DNA. *Aquaculture*, 126(1-2), 1-9.  
[https://doi.org/10.1016/0044-8486\(94\)90243-7](https://doi.org/10.1016/0044-8486(94)90243-7)
- Jernelöv, A. (2017). Crayfish Plague in Europe. U: *The Long-Term Fate of Invasive Species: Aliens Forever or Integrated Immigrants with Time?* (91-103). Springer, Cham..  
<https://doi.org/10.1007/978-3-319-55396-2>
- Jussila, J., Makkonen, J., Vainikka, A., Kortet, R., & Kokko, H. (2014). Crayfish plague dilemma: how to be a courteous killer? *Boreal Env. Res.* 19: 235-244.
- Jussila, J., Makkonen, J., Vainikka, A., Kortet, R., & Kokko, H. (2011). Latent crayfish plague (*Aphanomyces astaci*) infection in a robust wild noble crayfish (*Astacus astacus*) population. *Aquaculture*, 321(1-2), 17-20.



- Kokko, H., Koistinen, L., Harlioğlu, M. M., Makkonen, J., Aydın, H., & Jussila, J. (2012). Recovering Turkish narrow clawed crayfish (*Astacus leptodactylus*) populations carry *Aphanomyces astaci*. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems*, (404), 12.
- Kozubíková, E., Viljamaa-Dirks, S., Heinikainen, S., & Petrusek, A. (2011). Spiny-cheek crayfish *Orconectes limosus* carry a novel genotype of the crayfish plague pathogen *Aphanomyces astaci*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 108(3), 214-216.
- Kozubíková-Balcarová, E., Beran, L., Ďuriš, Z., Fischer, D., Horká, I., Svobodová, J., & Petrusek, A. (2014). Status and recovery of indigenous crayfish populations after recent crayfish plague outbreaks in the Czech Republic. *Ethology Ecology & Evolution*, 26(2-3), 299-319.
- Kušar, D., Vrezec, A., Ocepek, M., & Jenčič, V. (2013). *Aphanomyces astaci* in wild crayfish populations in Slovenia: first report of persistent infection in a stone crayfish *Austropotamobius torrentium* population. *Diseases of aquatic organisms*, 103(2), 157-169.
- Lilley, J. H., Callinan, R. B., Chinabut, S., Kanchanakhan, S., MacRae, I. H., & Phillips, M. J. (1998). Epizootic ulcerative syndrome (EUS) technical handbook. The Aquatic Animal Health Research Institute, Bangkok. 88 pp
- Lindes, L. (1884). Gojenje raka po šumski potoci. *Šumarski list*, 5, 198-201
- Lowe, S., Browne, S., Boudjela, S. M. & De Poorter, M. (2004). 100 of the world's worst invasive alien species. A selection from the Global Invasive Species Database. *The Invasive Species Specialist Group (ISSG) of the World Conservation Union (IUCN)*.
- Maguire, I., Jelić, M., Klobučar, G., Delpy, M., Delaunay, C., & Grandjean, F. (2016). Prevalence of the pathogen *Aphanomyces astaci* in freshwater crayfish populations in Croatia. *Diseases of Aquatic Organisms*, 118(1), 45–53.  
<https://doi.org/10.3354/dao02955>
- Makkonen, J., Kokko, H., Vainikka, A., Kortet, R., & Jussila, J. (2014). Dose-dependent mortality of the noble crayfish (*Astacus astacus*) to different strains of the crayfish plague (*Aphanomyces astaci*). *Journal of invertebrate pathology*, 115, 86-91.
- Matthews, M., & Reynolds, J. D. (1992). Ecological impact of crayfish plague in Ireland. *Hydrobiologia*, 234(1), 1-6.
- McDonald, M. (1983). Report of the United State Commissioner of Fish and Fisheries for the Fiscal years 1889-1890 and 1890-1991
- Mendoza, L. (2009). *Pythium insidiosum* and mammalian hosts. U: K. Lamour i S. Kamoun (eds.). *Oomycete Genetics and Genomics: Diversity, Interactions and Research Tools*. New Jersey, 387-405.

- Mrugała, A., Šanda, R., Petrusek, A., Marić, D., & Vukić, J. (2017). Recent acute crayfish mortality reveals *Aphanomyces astaci* presence in Bosnia and Herzegovina. *Journal of Invertebrate Pathology*, 150(September), 73–75.  
<https://doi.org/10.1016/j.jip.2017.09.004>
- Mrugała, A., Kozubíková-Balcarová, E., Chucholl, C., Cabanillas Resino, S., Viljamaa-Dirks, S., Vukić, J., & Petrusek, A. (2015). Trade of ornamental crayfish in Europe as a possible introduction pathway for important crustacean diseases: crayfish plague and white spot syndrome. *Biological Invasions*, 17(5), 1313–1326.  
<https://doi.org/10.1007/s10530-014-0795-x>
- Nagasawa, H. (2012). The crustacean cuticle: structure, composition and mineralization. *Front Biosci*, 4, 711-20.
- Ninni, A. P. (1865). Sulla mortalità dei gamberi (*Astacus fluviatilis*, L.) nel Veneto e più particolarmente nella provincia trevigiana. *Atti del Reale Istituto Veneto*, 10, 1203-1209.
- Nyström, P., & Strand, J. A. (1996). Grazing by a native and an exotic crayfish on aquatic macrophytes. *Freshwater Biology*, 36, 673–682.
- Oidtmann, B. (2012). Review of Biological Factors Relevant to Import Risk Assessments for Epizootic Ulcerative Syndrome (*Aphanomyces invadans*). *Transboundary and Emerging Diseases*, 59(1), 26–39.  
<https://doi.org/10.1111/j.1865-1682.2011.01241.x>
- Oidtmann, B., Heitz, E., Rogers, D., & Hoffmann, R. W. (2002). Transmission of crayfish plague. *Diseases of aquatic organisms*, 52(2), 159-167.
- Paine, R. T. (1969). A note on trophic complexity and community stability. *The American Naturalist*, 103(929), 91-93.
- Panteleit, J., Keller, N. S., Kokko, H., Jussila, J., Makkonen, J., Theissinger, K., & Schrimpf, A. (2017). Investigation of ornamental crayfish reveals new carrier species of the crayfish plague pathogen (*Aphanomyces astaci*). *Aquatic Invasions*, 12(1), 77–83.  
<https://doi.org/10.3391/ai.2017.12.1.08>
- Papavlasopoulou, I., Perdikaris, C., Vardakas, L., & Paschos, I. (2014). Enemy at the gates: introduction potential of non-indigenous freshwater crayfish in Greece via the aquarium trade. *Central European Journal of Biology*, 9(1), 11-18.
- Pârvulescu, L., Schrimpf, A., Kozubíková, E., Resino, S. C., Vrålstad, T., Petrusek, A., & Schulz, R. (2012). Invasive crayfish and crayfish plague on the move: First detection of the plague agent *Aphanomyces astaci* in the Romanian Danube. *Diseases of Aquatic Organisms*, 98(1), 85–94.  
<https://doi.org/10.3354/dao02432>
- Persson, M., & Söderhäll, K. (1983). *Pacifastacus leniusculus* Dana and its resistance to the parasitic fungus *Aphanomyces astaci* Schikora. *Freshwater Crayfish*, 5, 292-298.

- Plančić, J. 1973. Rakovi u našim slatkim vodama. U: Z. Livojević (ed.). Izbor naučnih stručnih radova. Zagreb, 133–143
- Power, M. E., Tilman, D., Estes, J. A., Menge, B. A., Bond, W. J., Mills, L. S., Daily, G., Castilla, J.C., Lubchenco, J. & Paine, R. T. (1996). Challenges in the Quest for Keystones. *BioScience*, 46(8), 609–620.  
<https://doi.org/10.2307/1312990>
- Pravilnik o strogo zaštićenim vrstama. Narodne novine, br. 144/13
- Rantamäki, J., Cerenius, L., & Söderhäll, K. (1992). Prevention of transmission of the crayfish plague fungus (*Aphanomyces astaci*) to the freshwater crayfish *Astacus astacus* by treatment with MgCl<sub>2</sub>. *Aquaculture*, 104(1-2), 11-18.
- Rezinciuc, S., Sandoval-Sierra, J., Oidtmann, B., & Diéguez-Uribeondo, J. (2015). The Biology of Crayfish Plague Pathogen *Aphanomyces astaci*: Current Answers to Most Frequent Questions. *Freshwater Crayfish*, 182–204.  
<https://doi.org/10.1201/b18723-12>
- Rezinciuc, S., Galindo, J., Montserrat, J., & Diéguez-Uribeondo, J. (2014). AFLP-PCR and RAPD-PCR evidences of the transmission of the pathogen *Aphanomyces astaci* (Oomycetes) to wild populations of European crayfish from the invasive crayfish species, *Procambarus clarkii*. *Fungal Biology*, 118(7), 612–620.  
[doi:10.1016/j.funbio.2013.10.007](https://doi.org/10.1016/j.funbio.2013.10.007)
- Söderhäll, K., & Cerenius, L. (1998). Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. *Current Opinion in Immunology*, 10(1), 23–28.  
[https://doi.org/10.1016/S0952-7915\(98\)80026-5](https://doi.org/10.1016/S0952-7915(98)80026-5)
- Strand, D. A. (2013). Environmental DNA monitoring of the alien crayfish plague pathogen *Aphanomyces astaci* in freshwater systems. Doctoral dissertation, University of Oslo, department of biosciences, 188.
- Svoboda, J., Mrugała, A., Kozubíková-Balcarová, E., & Petrusek, A. (2017). Hosts and transmission of the crayfish plague pathogen *Aphanomyces astaci*: a review. *Journal of Fish Diseases*, 40(1), 127–140.  
<https://doi.org/10.1111/jfd.12472>
- Svoboda, J., Strand, D. A., Vrålstad, T., Grandjean, F., Edsman, L., Kozák, P., Kouba, A., Fristad, R.F., Bahadır Koca, S. & Petrusek, A. (2014). The crayfish plague pathogen can infect freshwater-inhabiting crabs. *Freshwater Biology*, 59(5), 918-929.
- Taugbøl, T., Skurdal, J., & Håstein, T. (1993). Crayfish plague and management strategies in Norway. *Biological Conservation*, 63(1), 75-82.
- Thines Marco, M., & Kamoun, S. (2010). Oomycete-plant coevolution: Recent advances and future prospects. *Current Opinion in Plant Biology*, 13(4), 427–433.  
<https://doi.org/10.1016/j.pbi.2010.04.001>

- Trožić-Borovac, S. (2011). Freshwater crayfish in Bosnia and Herzegovina: the first report on their distribution. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems*, (401), 26.
- Unestam, T. (1972). On the host range of origin of the crayfish plague fungus. *Reports of the Institute of Freshwater Research, Drottningholm* 52: 192-198
- Unestam, T. (1969). Resistance to the crayfish plague in some American, Japanese and European crayfishes. *Report of the Institute of Freshwater Research, Drottningholm*, 49, 202-209.
- Unestam, T., & Nylund, J.E. (1972). Blood reactions in vitro in crayfish against a fungal parasite, *Aphanomyces astaci*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 19(1), 94–106.  
doi:10.1016/0022-2011(72)90194-2
- Van Baalen, M. (1998). Coevolution of recovery ability and virulence. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 265(1393), 317-325.
- Van Den Berg, A. H., McLaggan, D., Diéguez-Urbeondo, J., & Van West, P. (2013). The impact of the water moulds *Saprolegnia diclina* and *Saprolegnia parasitica* on natural ecosystems and the aquaculture industry. *Fungal Biology Reviews*, 27(2), 33-42.
- Viljamaa-Dirks, S. (2016). Epidemiology of crayfish plague. Doctoral dissertation, Helsinki University, 62  
<https://dspace3.hulib.helsinki.fi/handle/10138/178244>
- Vorburger, C., & Ribi, G. (1999). Aggression and competition for shelter between a native and an introduced crayfish in Europe. *Freshwater biology*, 42(1), 111-119.
- Willoughby, L.G., Roberts, R.J. and Chinabut, S. (1995) *Aphanomyces invaderis* sp. nov., the fungal pathogen of freshwater tropical fishes affected by epizootic ulcerative syndrome (EUS). *Journal of Fish Diseases* 18, 273-275.
- Zakon o zaštiti prirode. Narodne novine, br. 80/13